



Centro Universitário de Brasília

Faculdade de Ciências da Saúde

VARIABILIDADE GENÉTICA DE *DALBERGIA NIGRA* (JACARANDÁ-DA-BAHIA) UTILIZANDO MARCADOR MOLECULAR RAPD

Raissa Maria Beatriz do Nascimento Olegário

Brasília – 2002

Centro Universitário de Brasília

Faculdade de Ciências da Saúde

Licenciatura em Ciências Biológicas

VARIABILIDADE GENÉTICA DE DALBERGIA NIGRA (JACARANDÁ-DA-BAHIA) UTILIZANDO MARCADOR MOLECULAR RAPD

Raissa Maria Beatriz do Nascimento Olegário

Monografia apresentada à Faculdade de Ciências da Saúde do Centro Universitário de Brasília como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Licenciado em Ciências Biológicas.

Orientação: Dra. Ana Yamaguishi Ciampi (EMBRAPA-CENARGEN - Recursos Genéticos e Biotecnologia)

Prof. Cláudio Henrique Cerri e Silva (FACS - UniCEUB)

Brasília – 2002.

Tenho tido muitas bênçãos na vida,
mas nenhuma delas é maior do que o
meu irmão Miguel Ângelo do
Nascimento Olegário.

É com muito amor que dedico este
trabalho a ele.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS, sem o qual não seria possível a minha existência.

Ao meu irmão Miguel Ângelo do Nascimento Olegário, pela amizade.

Aos colegas Valci Pereira da Silva, Flávia Roberta Borges Machado, Christina Cleo Vinson, Vânia Cristina Rennó Azevedo, Tályta Nayza Silva de Almeida, Andrielle Câmara Amaral, pelo companheirismo.

A Dra. Ana Yamaguishi Ciampi pelo incentivo, proporcionando os meios necessários a aprendizagem.

Em especial aos professores Luiz Carlos Bhering Nasser, Cláudio Henrique Cerri e Silva, Marcelo Ximenes A. Bizerril, pela valiosa orientação, paciência e respeito.

A EMBRAPA – Recursos Genéticos e Biotecnologia, por permitir a realização da pesquisa no Laboratório de Genética Vegetal, oferecendo a oportunidade de manejar os equipamentos para a análise genética.

RESUMO

O Jacarandá-da-Bahia pertencente a família Fabaceae, possui sua importância econômica devida a suas propriedades madeiras. Utilizado em larga escala, principalmente para revestimento de móveis, fundo de violões e acabamentos internos em construção civil. Sua exploração em florestas tropicais tem contribuído para a redução dos recursos naturais. O projeto visa a manutenção da maior variabilidade genética possível, uma vez que, perdas desta variabilidade podem resultar em uma flexibilidade evolutiva reduzida e em uma diminuição do valor adaptativo e, visa também, a geração de subsídios aos programas de coleta e conservação *ex situ* e *in situ*. Para esta análise foi utilizada a técnica de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), um marcador molecular dominante, ideal para determinação de sistemas de cruzamento, variabilidade entre e dentro populações. Foram coletados na Mata Atlântica, amostras de câmbios e folhas de indivíduos de duas populações de *Dalbergia nigra*. Numa análise prévia foram comparados 16 amostras da população 1 em Marliéria-MG e 4 da população 2 em Dionízio-MG. Os DNAs de câmbios e folhas adultas foram extraídos utilizando protocolo CTAB 2% , e posteriormente foram purificados com Cloreto de Sódio (NaCl) em alta concentração e submetidas a reações RAPDs. Da seleção de 39 *primers*, foram escolhidos 25 *primers* com maior número de bandas polimórficas. Foram obtidos 183 marcadores RAPD polimórficos, os quais foram analisados pelo programa NTSYS, utilizando o coeficiente DICE pelo método de agrupamento UPGMA.

Palavras-chave: Jacarandá, RAPD, variabilidade genética.

SUMÁRIO

Introdução	1
Variabilidade Genética	1
<i>Dalbergia nigra</i> (Jacarandá-da-Bahia)	2
Marcadores moleculares (RAPD)	3
Justificativa	6
Objetivo	6
Materiais e métodos	6
O material vegetal e a extração de DNA	6
A quantificação do DNA genômico.....	8
A purificação do DNA genômico	8
A seleção de primers.....	9
O ensaio RAPD.....	9
A análise de dados	10
Resultados	12
Discussão	13
Considerações finais	14
Referências Bibliográficas.....	15
Anexos	17

1. INTRODUÇÃO

1.1. VARIABILIDADE GENÉTICA

O melhoramento de plantas ocorre com base na variabilidade genética. Os indivíduos de uma população de plantas geralmente diferem entre si em diversos caracteres, sendo que esta variabilidade pode ser determinada pelos efeitos genéticos e do ambiente. Na escolha de genitores, o melhorista seleciona plantas de seu interesse e realiza a hibridação esperando que ocorra segregação na progênie. Geralmente, a escolha está fundamentada na diferença entre os pais, pois, quanto maior for a distância genética, maior será a segregação, e, portanto, maiores as possibilidades da ocorrência de genótipos superiores com constituições ajustadas ao ambiente (Melchinger *et al.*, 1994).

A variabilidade genética existente dentro e entre as espécies de plantas está intimamente relacionada com a sua evolução. Antes do surgimento da agricultura, ocorria a domesticação das plantas selvagens, processo pelo qual as plantas adquiriram características como a perda da disseminação natural, o aumento das inflorescências, redução da toxicidade, entre outras. Tal processo foi chamado de síndrome de domesticação, evidenciando que o melhoramento genético já acontecia desde os primórdios da humanidade. Estas primeiras populações melhoradas deram origem às chamadas “landraces” ou variedades crioulas, as quais são a base das cultivares atuais (Harlan, 1992). Embora o jacarandá-da-bahia seja considerado uma espécie de ampla base genética (Melchinger *et al.*, 1994), a pressão da exploração tem contribuído para uma crescente redução na variabilidade genética.

Na implantação de um programa de melhoramento, uma das principais necessidades do melhorista é o conhecimento do germoplasma disponível e a posterior capacidade de identificar plantas de uma progênie segregante que possua genes de interesse (Weeden *et al.*, 1994; Menkir *et al.*, 1997). Parte do processo de escolhas das combinações entre os genótipos depende da capacidade inata do melhorista. Entretanto, o progressivo conhecimento das bases genéticas de caracteres de interesse agrônômico tem sido de extrema importância. O reconhecimento de um

genótipo ou o cálculo da similaridade genética entre os indivíduos podem ser realizados de diferentes maneiras, podendo ser baseado em análises de genealogia, de caracteres morfológicos, e, mais recentemente, em marcadores moleculares ao nível de DNA (Melchinger *et al.*, 1994).

1.2. *DALBERGIA NIGRA* (JACARANDÁ-DA-BAHIA)

Dalbergia nigra, popularmente conhecida como jacarandá-da-bahia, jacarandá-preto, jacarandá, jacarandá-cabiúna, jacarandá-una, jacarandá-caviúna, jacarandazinho, caviúna, cabiúna, cabiúna-rajada, cabiúna-do-mato, graúna, caviúno, pau-preto, etc, é uma espécie arbórea pertencente a família Fabaceae muito comum nas matas (figura 1). Apresenta altura de 15 a 25m, com tronco de 40 a 80 cm de diâmetro, tendo com ocorrência nos Estados BA, ES, MG, RJ e SP, na floresta pluvial atlântica. Floresce nos meses de setembro a novembro e a maturação dos frutos inicia-se no mês de agosto a setembro. As folhas são compostas imparipinadas, 11 a 17 folíolos glabrescentes de 12 a 15 mm de comprimento, lisos (figura 2). As flores são minúsculas, em cacho e claras. O fruto possui vagens marrons com uma ou duas sementes. As sementes são pequenas, de 1cm e marrons. Como foi muito explorada e seu crescimento é lento, a encontramos em porte pequeno, no máximo médio. Ornamental, é largamente utilizada no paisagismo em geral (Lorenzi,1992). Como planta rústica e adaptada a terrenos secos, é ótima para plantios mistos em terrenos degradados de preservação permanente. Tem sua importância econômica devido as suas propriedades madeireiras e é utilizado em larga escala para mobiliário de luxo, sendo conhecido seu emprego na construção de piano, também para acabamentos internos em construção civil, como lambris, molduras, portas, rodapés, para folhas fraqueadas decorativas, revestimento de móveis, caixas de rádios e televisões, peças torneadas, instrumentos musicais, etc. Sua constante exploração em florestas tropicais tem contribuído para a redução dos recursos naturais, sendo assim ameaçada de extinção. Devido a baixas respostas demográficas, surge a necessidade

de uma melhor compreensão na distribuição da variabilidade genética existente nas diferentes populações desta espécie.

1.3. MARCADORES MOLECULARES RAPD

Um dos maiores problemas dos recursos genéticos é a ausência de informações, principalmente daquelas relacionadas com a documentação e a característica genética, e culmina com a carência de estudos sobre o conhecimento da diversidade genética das espécies com potencial econômico para a região. Nesse sentido, a caracterização de germoplasma é necessária, com vistas a assegurar informações sobre essas fontes de genes para utilização futura, que, além de prevenirem a perda desses recursos, são fundamentais para o sucesso da sua produção agrícola.

Graças ao avanço na área de marcadores moleculares de PCR (Reação de Polimerase em Cadeia), é possível estudar melhor o comportamento de organismos de interesse econômico. Trata-se de um processo cíclico, no qual a enzima DNA polimerase faz cópias de um DNA, para o qual iniciadores (*primers* – oligonucleotídeos) específicos são fornecidos, sendo que, em cada ciclo, o número de cópias é duplicado, produzindo um aumento exponencial do mesmo. O processo envolve as fases de desnaturação das fitas de DNA; anelamento dos oligonucleotídeos; extensão e polimerização pela enzima DNA polimerase (Góes, 1999).

Essa técnica, desenvolvida por Williams *et al.*, (1990), distingue-se das demais técnicas de PCR pelo fato de se utilizar um “único” *primer*, composto por 10 pares de bases de seqüências nucleotídicas arbitrárias, tendo, portanto, sua seqüência alvo desconhecida (Ferreira & Grattapaglia, 1995), ao contrário das outras que requerem informações a respeito da seqüência do DNA alvo para o desenho de *primers* específicos (Williams *et al.*, 1990), o que permite a realização de estudos de análise genética em diversas espécies.

Mediante a utilização dessa técnica, detectam-se vários polimorfismos entre diferentes populações e/ou indivíduos (presença x ausência dos produtos de amplificação), visto que as seqüências internas dos segmentos amplificados pertencem a todas as classes de abundância de DNA no genoma, desde seqüências de cópia única até as altamente repetitivas. Parte-se do princípio de que os sítios de hibridização do *primer* estão distribuídos ao acaso pelo genoma e que as diferenças nesses sítios resultam na amplificação de fragmentos distintos (de tamanhos variáveis), que podem ser utilizados como marcadores moleculares (Bardakci & Skibinski, 1994). Sendo, portanto, o polimorfismo detectado pela presença de um fragmento específico amplificado em um indivíduo comparado com a ausência dele em outro indivíduo (Williams *et al.*, 1990; Fairbanks *et al.*, 1991).

O polimorfismo gerado pode ser devido a uma troca única de base, na qual previne uma associação estável com o *primer* ou mudanças que alterem o tamanho (pequenas inserções ou deleções) ou previnam a amplificação dos fragmentos (inserções que separem os sítios em mais de 3.000 bp, inversões, deleções); (Waulgh & Powell, 1992). O poder de detecção do polimorfismo, na técnica RAPD (polimorfismos de DNA amplificados ao acaso), pode ser analisado diretamente em gel de agarose. Os fragmentos separados por eletroforese, visualizados em UV quando ligados a brometo de etídio é, na grande maioria dos casos, uma vantagem significativa para a detecção da variabilidade genética com baixo custo e curto prazo, para espécie em perigo de extinção..

Muito embora a técnica de RAPD resulte em uma série de vantagens, visto que apresenta uma notável simplicidade e rapidez, ela é bastante sensível, e pequenas modificações na concentração dos componentes da reação são capazes de produzir alterações no padrão dos marcadores obtidos. Em decorrência disso, é recomendável uma otimização cuidadosa das condições experimentais para que se possam obter amplificações reproduzíveis e confiáveis (Timmerman & Mccallum, 1993).

O potencial de uso de marcadores moleculares no melhoramento de plantas é bastante amplo, destacando-se a identificação e discriminação de genótipos, quantificação da variabilidade genética ao nível de seqüências de nucleotídeos no

DNA e sua correlação com a expressão fenotípica, identificação de origem parental e testes de paternidade, identificação e proteção de cultivares, avaliação de linhagens pela previsão da produtividade de seus híbridos, alocação de linhagens em grupos heteróticos, certificação de pureza genética, monitoramento de cruzamentos, caracterização de germoplasmas, estudos de diversidade e distância genética, construção de mapas genéticos e auxílio na seleção. Os marcadores moleculares são especialmente úteis na identificação e seleção para locos de caracteres quantitativos (QTL's). Esses locos podem ser responsáveis por alta proporção da variação fenotípica. Os marcadores moleculares podem possibilitar importantes informações quanto ao número, posição cromossômica, magnitude do efeito e interações entre esses locos.

2. JUSTIFICATIVA

Devido às baixas respostas demográficas e raridade de algumas espécies em florestas nativas, surge à necessidade de um melhor entendimento na distribuição da variabilidade genética existente nas diferentes populações na espécie.

3. OBJETIVO

Analisar a variabilidade genética existente nas populações da espécie arbórea – *Dalbergia nigra* – no seu bioma de ocorrência, Mata Atlântica, através da técnica RAPD; gerar subsídios aos programas de coleta e conservação *ex situ* e *in situ*; comparar a qualidade de DNA isolada a partir de folha e câmbio.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. O MATERIAL VEGETAL E A EXTRAÇÃO DE DNA

O material analisado foi composto por câmbios e folhas de indivíduos adultos em duas populações desta espécie arbórea no seu bioma característico: população 1 composta por 16 indivíduos (DNA3, DNRDN3, DNRDN5, DNA12, DNRDN12, DNRDN14, DNRDN15, DNRDN16, DAN18, DNRDN18, DNA20, DNRDN20, DNA21, DNRDN21, DNA24, DNRDN24) e população 2 composta por 04 indivíduos (DNA5, DNA14, DNA15, DNA16). Na população 1 os indivíduos foram coletados no Parque Estadual do Rio Doce, Marliéria – MG (PERD) e na população 2 os indivíduos foram coletados em Dionízio – MG.

A coleta de amostras dessa espécie se deu através da retirada de ramos pequenos com folhas novas de indivíduos adultos, mantidos no gelo até chegar no laboratório e posteriormente congelado a -20°C . No caso de câmbios, foram retirados com um instrumento apropriado para extrair amostras de madeira de 0,7 cm de diâmetro e estes foram transportados em tubos de 2ml com tampão de transporte

(CTAB, etanol e ácido ascórbico) e posteriormente armazenado a -20°C ao chegar no laboratório.

O DNA foi extraído de acordo com o protocolo CTAB 2% de Ferreira & Grattapaglia, 1995.

A seleção de alguns câmbios e folhas adultos novos em tamanho adequado, cortados e colocados em “eppendorf” de 1.5 ml. As folhas foram trituradas em nitrogênio líquido. A cada tubo foram adicionados 700 μl de tampão de extração CTAB 2% mais mercaptoetanol e foram colocados em banho-maria a uma temperatura entre 60°C e 65°C durante quarenta e cinco minutos. Durante a incubação os tubos foram agitados de dez em dez minutos com o fim de homogeneizar a suspensão. Após o banho-maria os tubos foram esfriados à temperatura ambiente por alguns minutos e a cada um foram adicionados 600 μl de um solvente orgânico (clorofórmico – álcool isoamílico na proporção de 24:1). Depois os tubos foram agitados para formar uma emulsão homogênea. Os tubos foram centrifugados em uma microcentrífuga com a velocidade máxima de 12000 rpm durante dez minutos. Os tubos foram retirados da centrífuga de modo que as duas fases não fossem novamente misturadas. A fase superior foi pipetada para um novo tubo (etapa realizada duas vezes) e foram adicionados 400 μl de 2 – isopropanol (-20°C), os tubos foram gentilmente agitados e colocados a uma temperatura de -20°C durante 30 minutos para que os ácidos nucléicos fossem precipitados. Os tubos foram centrifugados a 12000 rpm em uma microcentrífuga durante 5 minutos para que o DNA (pellets) fossem precipitados. Foi feita a lavagem dos “pellets”, onde foi retirado cuidadosamente o 2-propanol e em seguida foram adicionados 500 μl de etanol 70% e deixados em descanso durante 5 minutos. Depois retirou-se gentilmente o álcool e repetiu-se o procedimento mais uma vez. Para finalizar o processo de purificação do DNA foram adicionados 500 μl de etanol absoluto (95%) durante 5 minutos e após o término do tempo retirou-se todo o etanol e os “pellets” foram colocados para secar durante a noite. Aos “pellets” secos foram adicionados de 20 μl a 100 μl de tampão TE contendo 10 ng/ml de RNase. Para os indivíduos folhas foi necessário fazer uma nova extração com fenol devido a impurezas nos DNAs.

4.2. A QUANTIFICAÇÃO DO DNA GENÔMICO

O DNA extraído foi quantificado em mini-gel de agarose 1% (0,3 g de agarose e 30 ml de TBE – Tris Base, ácido bórico, EDTA - 1X (54 g de Tris Base, 27.5 g de ácido bórico, 20 ml de 0,5 EDTA, pH 8) mais tampão de carregamento 3X (40% de sacarose, 0,25% de azul de bromofenol e 10% de brometo de etídeo), visualizado em luz ultravioleta, comparando-se com λ DNA padrão da Gibco (0,45 ng/ μ l) nas concentrações conhecidas de 20, 50, 100 e 200 ng/ μ l (figura 3).

Foram feitas diluições das amostras para uma concentração final de 1ng/ μ l de DNA. As amostras foram quantificadas novamente e uma segunda diluição (e terceira em certos casos) foi feita para verificar a concentração final desejada.

4.3. A PURIFICAÇÃO DO DNA GENÔMICO

Para a purificação do DNA genômico dos câmbios e folhas utilizou-se Cloreto de Sódio (NaCl) em alta concentração devido a problemas de amplificação. Entretanto, para as folhas, foi utilizado também um kit de purificação: o kit Promega – as espécies encontravam-se impuras e geraram problemas de amplificação.

Foram aliquotados 100 μ l de Direct Purification Buffer (tampão) em “eppendorf” de 1,5 ml. A quantidade de DNA que existia (30-300 μ l) foi adicionada. Em seguida, adicionou-se 1 ml de resina agitando-se rapidamente 3 vezes em 1 minuto. Para cada amostra de DNA preparou-se uma minicoluna (Wizard) e adaptou-se uma seringa. A solução de DNA preparada anteriormente foi pipetada na seringa. Inseriu-se lentamente o êmbolo empurrando bem devagar para a minicoluna. A minicoluna foi solta da seringa e removeu-se o êmbolo. A minicoluna foi presa novamente a seringa. Foram pipetados 2ml de isopropanol 80% na seringa para lavar a coluna. O êmbolo foi readaptado na seringa e gentilmente empurrou-se o isopropanol através da minicoluna. Removeu-se a seringa e transferiu-se a minicoluna para um “eppendorf” de 1,5 ml. Centrifugou-se a minicoluna por 2 minutos (12000rpm) para descer a resina. A minicoluna foi transferida para um novo

tubo. Aplicou-se 20 µl de água (65 °C-80 °C) ou TE Buffer na minicoluna e deixou por 1 minuto. Centrifugou-se a minicoluna por 20 segundos. Removeu-se e descartou-se a minicoluna. O DNA purificado foi quantificado e conservado a -20 °C.

4.4. A SELEÇÃO DE PRIMERS

Conhecida como *screening*, consiste em uma triagem do *primer* para verificar a amplificação e maior presença de fragmentos polimórficos robustos entre os indivíduos das populações estudadas.

Utilizou-se 04 indivíduos em 48 *primers* distintos com 10 bases, da Operon Technologies Inc., desse total, verificou-se 39 *primers*, os quais apresentaram boas amplificações e desses, foram selecionados 25 *primers* que apresentaram mais bandas polimórficas: AI04, AI08, D08, G03, G13, K04, P04, P06, P14, P17, P18, Q13, T08, T15, W06, W07, W16, W17, X06, X14, Y07, Y11, Y15, Y16. O número de bandas polimórficas variou de 4 a 6 por *primer*.

4.5. O ENSAIO RAPD

A amplificação do DNA foi feita por meio de RAPD, uma técnica de PCR (*Polimerase Chain Reaction*), na qual utiliza-se um único *primer*.

Utilizou-se 2,0 µl de DNA (concentração de 1,0 ng/µl) e 1,0 µl de água milliQ e um coquetel de reagentes composto por 3,42 µl de água milliQ e autoclavada, 1,30 µl de tampão de PCR 10X com MgCl₂ (15 mM), 1,04 µl de dNTPs (2,5 mM), 1,04 µl de BSA (2,5 mg/ml), 3,00 µl de *primer* (10 ng/µl), 0,20 µl de Taq DNA polimerase (5 unidades/µl) e 50 µl de óleo mineral adicionado ao final, com o objetivo de evitar a evaporação da reação.

A reação quando concluída foi submetida a um termociclador com condições de amplificação de DNA descritas por Willians *et al* (1990). Um ciclo de 4 minutos

repetido 40 vezes, onde ocorreu desnaturação do DNA a 92 °C por 1 minuto, anelamento do *primer* a 35 °C por 1 minuto e extensão da Taq polimerase e incorporação de nucleotídeos a 72 °C por 2 minutos, ao final uma extensão de 7 minutos a 72 °C para finalizar os produtos amplificados. O ciclo todo levou 4 horas e 30 minutos.

As reações foram submetidas a uma eletroforese (técnica que se baseia na movimentação de moléculas, como ácidos nucleicos, através de uma matriz tamponada, no caso TBE 1X, que funciona como filtro separando as moléculas de acordo com o tamanho e carga elétrica que possuem). Esta eletroforese foi realizada em geral de agarose e 600 ml de TBE 1X), corado com brometo de etídeo cujos produtos da amplificação foram separados sob uma voltagem constante de 110 Volts durante 4 horas e 30 minutos. Utilizou-se um DNA com pesos padrões conhecidos, Ladder 1Kb (35ng/μl; 33 μl de Ladder, 800 μl de TE e 167 μl de tampão de carregamento 3X).

A visualização das amplificações de fragmentos de DNA foi realizada com detecção em luz ultravioleta e os resultados foram fotografados por uma câmera acoplada a um sistema computadorizado chamado de Eagle Eye II – Stratagene (figura 4). Essas fotos foram arquivadas em ata para serem analisadas.

4.6. A ANÁLISE DE DADOS

A análise de dados foi realizada na observação das fotos com base no polimorfismo das bandas mais evidentes, chamadas de marcadores RAPD. Uma planilha foi construída no *Microsoft Excell* utilizando a relação indivíduo e *primers* com seus respectivos pesos moleculares com o intuito de gerar dados para uma matriz de similaridade na qual foram fornecidas as informações necessárias para os resultados finais.

Os valores da planilha foram determinados de acordo com a presença ou a ausência de bandas ou marcadores. Quando um marcador estava presente em um indivíduo foi fornecido ao mesmo, na planilha, o número 1, caso contrário, ou seja,

na ausência da banda, foi fornecido o número 0 e no caso de dúvidas, forneceu-se o número 9. Depois de pronta a planilha, a matriz de similaridade foi gerada por um programa de análises estatísticas multivariadas que mostrou as distâncias genéticas entre os indivíduos na população, e, entre as populações, a partir de diferentes tipos de coeficientes estatísticos. Escolheu-se o coeficiente de Dice devido a sua característica de evidenciar a presença de bandas ao invés da ausência. Seguiu-se a fórmula de Dice:

$$D = \frac{2a}{a + b + c}$$

onde:

a = número de marcadores presentes em ambos os indivíduos;

b = marcador presente no primeiro e ausente no segundo;

c = marcador ausente no primeiro e ausente no segundo;

A ausência no primeiro e segundo é desprezada.

O programa de análise utilizado chamado NTSYS versão 2.02 pc (Rohlf, F.J. 1993) teve como função a Análise Estatística Multivariada de diferentes análises com matrizes de similaridade e dissimilaridade. A matriz de similaridade e agrupamento para esta análise foi feita por UPGMA (Unweighted Pairgroup Method, Arithmetic Average) agrupando os indivíduos par a par e organizando-os em forma de dendrograma (figura 5).

5.0. RESULTADOS

A técnica RAPD foi otimizada, com sucesso, nesta espécie, em sua análise genética. Os 25 *primers* geraram 183 marcadores RAPD. A imagem do gel de agarose (figura 4) mostrou as amplificações dos indivíduos purificados, devido aos DNAs extraídos repletos de impurezas com peculiaridades na natureza fisiológica da planta ou da coleta e armazenamento não adequados a essa espécie. Alguns mesmo após a purificação, apresentaram falhas.

O dendrograma (figura 5) mostrou máxima similaridade entre mesmos indivíduos com DNAs extraídos de folha e câmbio, indicando a utilização de estratégia de coleta e caule, facilitando a coleta de material biológico para extração de DNA em arbóreas de grande porte.

Na análise de 21 indivíduos com 183 marcadores RAPDs (figura 6) foi observado uma similaridade de 79%. Este resultado mostrou média para baixa variabilidade de *Dalbergia nigra* – Jacarandá-da-Bahia da região do Parque Estadual do Rio Doce, Marliéria – MG (PERD) e Dionízio – MG do bioma Mata Atlântica.

A qualidade do DNA foi verificada na eletroforese da quantificação em gel de agarose. Na visualização, observou-se bandas sem rastros, indicando a ausência da degradação causada pelos compostos secundários da oxidação e outras impurezas. (Figura 3).

A reproducibilidade dos fragmentos na amplificação das reações RAPDs, indicou boa qualidade do DNA das folhas e dos câmbios.

A análise dos câmbios foi demorada, uma vez que o DNA destes apresentaram problemas, ou seja, não havendo conhecimento se de natureza fisiológica ou manuseio do material coletado, geraram problemas na amplificação de alguns indivíduos no início, entretanto, o problema foi posteriormente resolvido através da purificação do material.

6.0. DISCUSSÃO

Os DNAs genômicos de alta qualidade foram obtidos a partir de folhas e de câmbios. As vantagens encontradas ao uso de câmbios foram: pouca oxidação durante o transporte e conseqüentemente facilitou a extração, embora necessitasse um tratamento com NaCl para a eliminação de polissacarídeos. No caso das folhas, usou-se um tratamento com fenol para a eliminação de compostos secundários da oxidação. Estes compostos foram formados desde a coleta, transporte para o laboratório e durante a extração; a facilidade na coleta e durabilidade no transporte de material do campo ao laboratório e na conservação por período longo.

Estratégias de coleta para conservação deverão cobrir o máximo da área com amostragens grandes, no sentido de preservar o máximo de genótipos de jacarandá-da-Bahia.

Em relação ao uso, a madeira do jacarandá-da-bahia (figura 2) em condições favoráveis ao apodrecimento, é considerada de alta resistência ao ataque de organismos xilófagos, segundo observações práticas a respeito de sua utilização.

7.0. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Estudos de sistema reprodutivo estão sendo realizados com análise genética por RAPD de 10 famílias de *Dalbergia nigra* – Jacarandá-da-Bahia da região do Parque Estadual do Rio Doce, MG – Mata Atlântica.

A extinção de materiais cultivados ou existentes nos centros de diversidade, conhecida como “erosão genética” é altamente preocupante, por implicar na perda de genes valiosos que podem ser de importância em futuros programas de melhoramento genético. Para solucionar esses problemas tornou-se necessária a formação de coleções de germoplasma contendo o maior número possível de componentes genéticos, com a maior variabilidade possível (bancos de germoplasma).

8.0. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARDAKCI, F.; SKIBINSKI, D.O.F. Application of the RAPD technique in tilapia fish: species and subspecies identification. **Heredity**, v.73, p.117-132. 1994.

FAIRBANKS, D.J.; ANDERSEN, W.R.; MAUGHAM, P.J. **Analyses for Biological resource characterization**: a laboratory manual. Provo: Brigham Young University, 1991. 27p.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1996. 220p.

GÓES, L.B. **Polimorfismo de DNA em isolados de *Trichoderma* e antagonismo a *Rhizoctonia solani***. Recife: UFPE, 1999. 76p. Dissertação Mestrado.

HARLAN, J.R.1992. **Crops and Man**. Madison: American Society of Agronomy, 284p.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil, Nova Odessa, SP: Ed. Plantarum, 1992.

MELCHINGER, A.E.; GRANER, A.; SINGH, M.; MESSMER, M.M. Relationships among european barley germplasms: I. Genetic diversity among winter and spring cultivars revealed by RFLPs. **Crop Science**, vol.37, p.1191-1199, 1994.

MENKIR, A.; GOLDSBROUGH, P.; EJETA, G. RAPD based assessment of genetic diversity in cultivated races of sorghum. **Crop Science**, vol37, p.564-569, 1997.

TIMMERMAN, G.M.; MCCALLUM, J.A. Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in plant biology. In: INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESS, 17., 1993. **Proceedings...** 1993. p.1025-1031.

WAUGH, R.; POWELL, W. Using RAPD markers in crop improvement. **TIBTECH.** v.10, p.186-191, 1992.

WEEDEN, N.F.; TIMMERMAN, G.M.; LU, J. Identifying and mapping genes of economic significance. **Euphytica**, vol.73, p.191-198, 1994.

WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v.18. p.6531-6535, 1990.

JACARANDÁ-DA-BAHIA. <http://www.esalq.usp.br/trilhas/lei/lei19.htm>. Acesso em 27 out.2002.

9.0. ANEXOS



Figura 1 – Árvore de *Dalbergia nigra*. Fonte: www.esalq.usp.br



Figura 2 – Árvore de *Dalbergia nigra* e amostra de folhas e câmbio da árvore.
Fonte: Lorenzi, Árvores Brasileiras, vol.01.

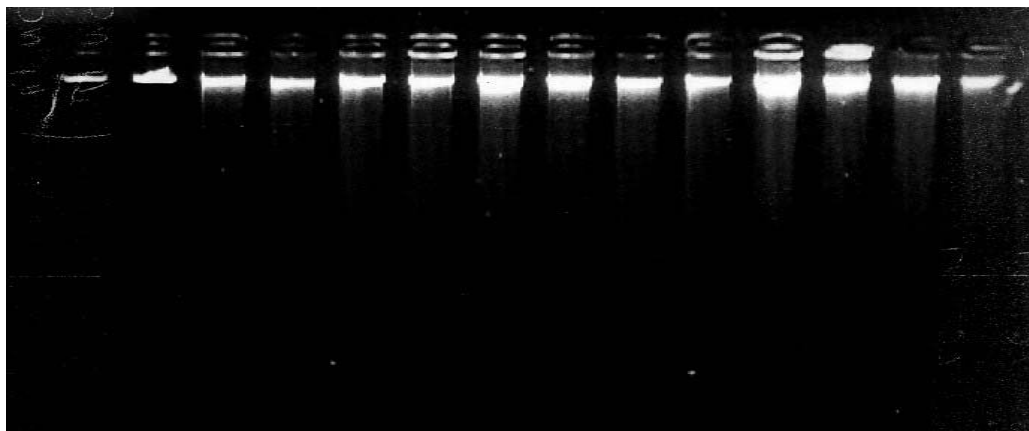


Figura 3 – Foto da quantificação dos DNAs dos indivíduos de *Dalbergia nigra* em mini gel de agarose 1%. λ DNA em concentração de 20, 50, 100 e 200 ng/ μ l na primeira, segunda, terceira e quarta colunas, respectivamente, da parte de cima do gel.

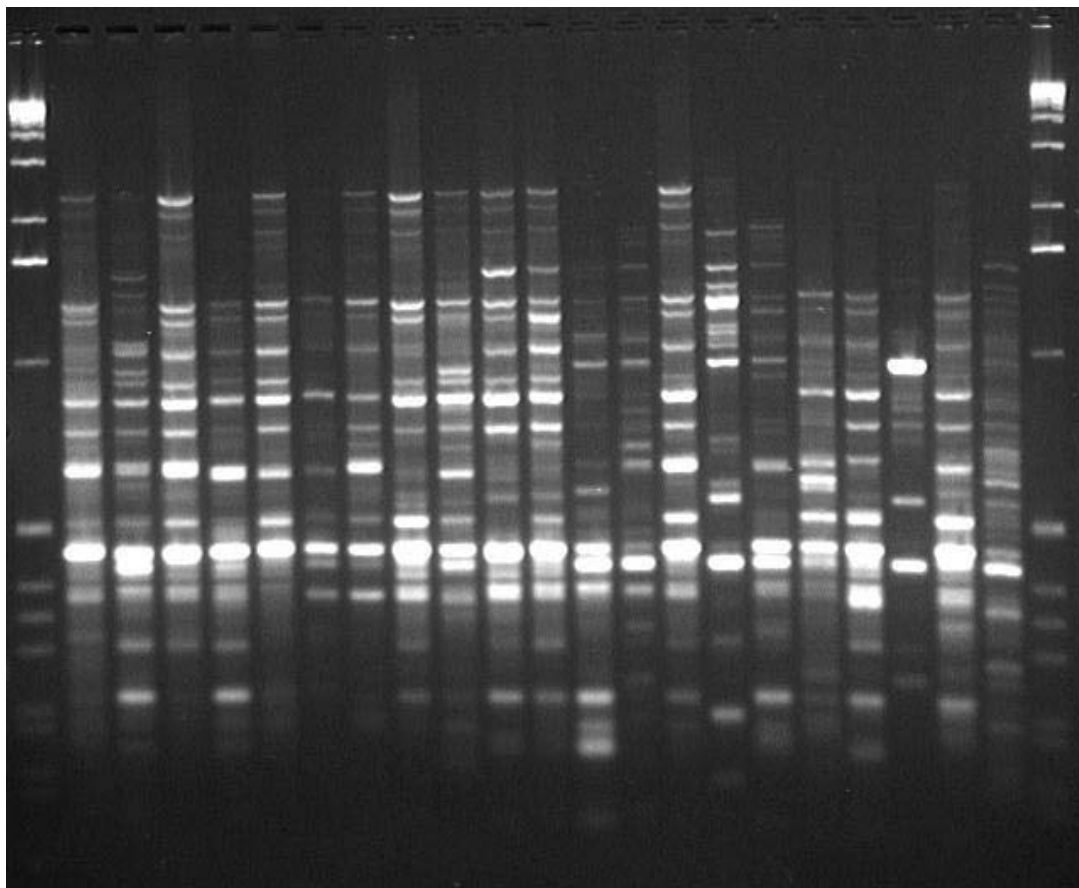


Figura 4 – Foto de gel de agarose, dos indivíduos de *Dalbergia nigra* do Parque Estadual do Rio Doce, Marliéria – MG e Dionízio - MG, população 1 e 2, amplificada pelo *primer* y-11 por RAPD.

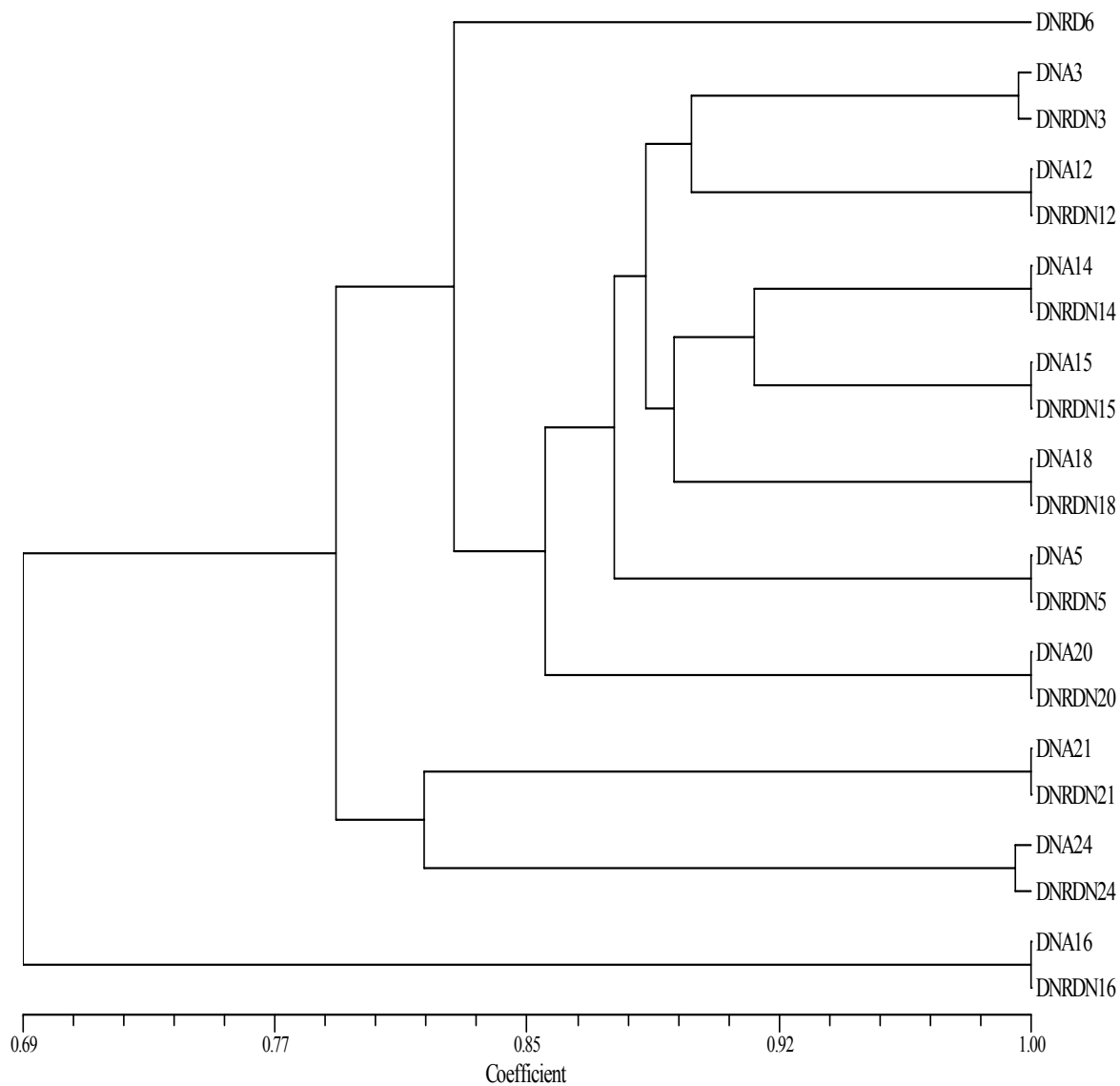


Figura 5 – Dendrograma mostrando o agrupamento dos indivíduos de *Dalbergia nigra* do Parque Estadual do Rio Doce, Marliéria - MG e Dionízio - MG, população 1 e 2, de acordo com a similaridade genética, obtido a partir de 183 marcadores RAPDs e 21 indivíduos.